

118
86-

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

Attachment
#17



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C12N 15/82, 9/16</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/45456</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Oktober 1998 (15.10.98)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02069</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. April 1998 (09.04.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 971 05 855.7 9. April 1997 (09.04.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IPK GATERSLEBEN {DE/DE}; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE). EBNETH, Marcus [DE/DE]; c/o Reichwaldt, Huber- tusstrasse 1, D-12163 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, IL, JP, KR, MX, NZ, RU, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02069</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. April 1998 (09.04.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 971 05 855.7 9. April 1997 (09.04.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IPK GATERSLEBEN {DE/DE}; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE). EBNETH, Marcus [DE/DE]; c/o Reichwaldt, Huber- tusstrasse 1, D-12163 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, IL, JP, KR, MX, NZ, RU, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02069</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. April 1998 (09.04.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 971 05 855.7 9. April 1997 (09.04.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IPK GATERSLEBEN {DE/DE}; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE). EBNETH, Marcus [DE/DE]; c/o Reichwaldt, Huber- tusstrasse 1, D-12163 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, IL, JP, KR, MX, NZ, RU, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>			
<p>(54) Title: 2-DEOXYGLUCOSE-6-PHOSPHATE (2-DOG-6-P) PHOSPHATASE DNA SEQUENCES AS SELECTION MARKERS IN PLANTS</p> <p>(54) Bezeichnung: 2-DESOXYGLUCOSE-6-PHOSPHAT (2-DOG-6-P) PHOSPHATASE DNA-SEQUENZEN ALS SELEKTIONS-MARKER IN PFLANZEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to recombinant DNA molecules containing a DNA sequence coding a protein with the biological activity of a 2-deoxyglucose-6-phosphate (2-DOG-6-P) phosphatase and controlled by regulatory sequences of a promoter and transcription, termination and/or polyadenylation signals active in plants. The invention further relates to vectors and host cells containing inventive recombinant DNA molecules. Also disclosed are methods for producing transformed plants cells and plants using the inventive recombinant DNA molecules and vectors. The invention also relates to transgenic plants, their crops and propagation materials and to plants cells and tissues containing inventive recombinant DNA molecules or produced according to the inventive method.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Es werden rekombinante DNA-Moleküle beschrieben, die eine DNA-Sequenz enthalten, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-Desoxyglucose-6-Phosphat (2-DOG-6-P) Phosphatase codiert und die unter der Kontrolle von regulatorischen Sequenzen eines in Pflanzen aktiven Promotors und Transkriptions-Terminations- und/oder Polyadenylierungssignalen steht. Weiterhin werden Vektoren und Wirtszellen beschrieben, die die erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküle enthalten. Ferner werden Verfahren zur Herstellung transformierter Pflanzenzellen und Pflanzen unter Verwendung der beschriebenen rekombinanten DNA-Moleküle und Vektoren bereitgestellt. Desweiteren werden transgene Pflanzen, deren Ernteprodukte und Vermehrungsmaterial sowie Pflanzenzellen und -gewebe beschrieben, die die erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküle oder Vektoren enthalten oder durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt werden.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

2-Desoxyglucose-6-Phosphat (2-DOG-6-P) Phosphatase DNA-Sequenzen als Selektionsmarker in Pflanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-Desoxyglucose-6-Phosphat (2-DOG-6-P) Phosphatase codieren, als Selektionsmarker in Pflanzenzellen zur Selektion transformierter Pflanzen. Weiterhin betrifft diese Erfindung rekombinante DNA-Moleküle, die derartige DNA-Sequenzen enthalten, wobei diese mit regulatorischen Sequenzen eines in Pflanzen aktiven Promotors und Transkriptions-Terminations- und/oder Polyadenylierungssignalen operativ verbunden sind. Ferner werden Vektoren, Wirtszellen und Kits beschrieben, die derartige rekombinante DNA-Moleküle enthalten, sowie mit den rekombinanten DNA-Molekülen transformierte Pflanzenzellen und Pflanzen. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, die aufgrund der Einführung der oben beschriebenen rekombinanten DNA-Moleküle auf 2-Desoxyglucose enthaltenden Medien selektioniert werden können. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzen, Pflanzenzellen und Gewebe, die das erfindungsgemäße DNA-Molekül enthalten oder durch das vorstehend beschriebene Verfahren erhalten werden, sowie Ernteprodukte und Vermehrungsmaterial der beschriebenen transgenen Pflanzen.

Mittels gentechnischer Verfahren ist es möglich, gezielt Fremdgene in das pflanzliche Genom zu übertragen. Dieser Prozeß wird als Transformation und die resultierenden Pflanzen als transgen bezeichnet. Die vornehmlichen Ziele sind zum einen der Pflanzenschutz und zum anderen eine Qualitätssteigerung der Ernteprodukte. Beispiele für Pflanzenschutzmaßnahmen sind: (i) herbizidtolerante Pflanzen (DE-A-3701623; Stalker (1988) Science 242, 419), (ii) insektenresistente Pflanzen (Vaek (1987) Plant Cell 5, 159-169), (iii) virusresistente Pflanzen (Powell (1986) Science 232, 738-743) und (vi) ozon-resistente Pflanzen (Van Camp (1994) BioTech. 12, 165-168). Beispiele für Qualitätssteigerungen sind: (i) Erhöhung der

Haltbarkeit von Früchten (Oeller (1991) Science 254, 437-439), (ii) Erhöhung der Stärkeproduktion in Kartoffelknollen (Stark (1992) Science 242, 419), (iii) Veränderung der Stärke- (Visser (1991) Mol. Gen. Genet. 225, 289-296) und Lipidzusammensetzung (Voelker (1992) Science 257, 72-74) und (iv) Produktion Pflanzenfremder Polymere (Poirer (1992) Science 256, 520-523).

Grundvoraussetzung für die Erzeugung transgener Pflanzen ist die Verfügbarkeit geeigneter Transformationssysteme und das Vorhandensein selektionierbarer Marker, die die Identifizierung erfolgreich transformierter Pflanzenzellen ermöglichen.

Zur Transformation stehen derzeit mehrere Verfahren zur Verfügung. Die am häufigsten eingesetzte Methode zur Transformation dikotyledoner Pflanzen ist der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer. Hierbei wird die natürliche Fähigkeit des Bodenbakteriums ausgenutzt, genetisches Material in das pflanzliche Genom zu integrieren. Weitere geeignete Verfahren sind beispielsweise Protoplasten-Transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, Elektroporation, Sonikation oder Mikroinjektion sowie die Transformation intakter Zellen oder Gewebe durch Mikro- oder Makroinjektion in Gewebe oder Embryonen, Gewebeelektroporation, Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, Vakuuminfiltration von Samen und biolistischer Gentransfer.

Da unabhängig vom Transformationsverfahren nur wenige Zellen die gewünschten Eigenschaften tragen, wird in herkömmlicher Weise neben dem Zielgen ein selektionierbarer Marker in das pflanzliche Genom integriert, der die Identifizierung transgener Zellen ermöglicht. Derzeit werden zur Selektion transformierter Pflanzenzellen vornehmlich Gene eingesetzt, die eine Herbizid- oder Antibiotikateranz vermitteln. Geeignete Resistenzgene sind beispielsweise das bar-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*, das Resistenz gegen das Totalherbizid Phosphinothricin vermittelt (De Block (1987) EMBO J. 6, 2513-2518) oder das nptII-Gen aus dem Transposon Tn5 von *Escherichia coli*, das Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin bewirkt (Herrera-Estrella (1983) EMBO J. 2, 987-995). Je nach Pflanzenart, sind die genannten Verfahren nicht immer effektiv und beeinflussen häufig die Pflanzenregeneration negativ. Darüber hinaus ist der Einsatz von Genen, die Antibiotikaresistenzen vermitteln, im Lebensmittelbereich

unerwünscht. Desweiteren ist zur Steuerung komplexer Stoffwechselprozesse die Manipulation mehrerer enzymatischer Schritte notwendig. D.h. die Möglichkeit transgene Pflanzen mehrfach zu transformieren ist im Bereich des "Metabolic Engineering" essentiell. Die genannten Gründe haben dazu geführt, daß die Suche nach weiteren selektionierbaren Markern verstärkt vorangetrieben wird. Trotz intensiver Bemühungen sind nur wenige neue Marker zur Selektion transformierter Pflanzenzellen erfolgreich eingesetzt worden. Durch Expression einer Mannose-6-Phosphat Isomerase konnte eine positive Selektion auf Mannose-haltigen Nährmedien für transformierte Pflanzenzellen etabliert werden (WO 94/20627). Ein weiteres Verfahren nutzt die Fähigkeit einer Deaminase aus *Aspergillus terreus* aus, das Insektizid Blasticidin S zu detoxifizieren (Tamura (1995) Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 2336-2338).

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, rekombinante DNA-Moleküle zur Verfügung zu stellen, die eine DNA-Sequenz enthalten, die zur Selektion transformierter Pflanzenzellen oder Pflanzen eingesetzt werden kann.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein rekombinantes DNA-Molekül umfassend

- (a) regulatorische Sequenzen eines in Pflanzen aktiven Promotors;
- (b) operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-Desoxyglucose-6-Phosphat (2-DOG-6-P) Phosphatase codiert; und
- (c) operativ daran gebunden regulatorische Sequenzen, die als Transkriptions-Terminations- und/oder Polyadenylierungssignale in Pflanzen dienen können.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-DOG-6-P Phosphatase ein Protein verstanden, das in der Lage ist, nicht-metabolisierbare glucoseanaloge Verbindungen wie 2-DOG in nicht-toxische Produkte umzusetzen. Die toxische Wirkung von 2-DOG entsteht nach Phosphorylierung zum 2-DOG-6-P, d.h. die Phosphatase hebt die Wirkung von 2-DOG-6-P durch Dephosphorylierung auf. Ein alternativer Resistenzmechanismus,

der ebenfalls im Sinne der vorliegenden Erfindung genutzt werden kann, besteht darin, die Phosphorylierung oder die Aufnahme von 2-DOG zu unterbinden. Entsprechende Mutanten wurden in Hefe beschrieben, z.B. eine Transportmutante (Novak (1990) FEBS Lett. 269, 202-204) und eine Phosphorylierungsmutante (Lobo (1977) Mol. Gen. Genet. 157, 297-300).

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die Expression einer 2-DOG-6-P Phosphatase aus Hefe Resistenz gegenüber 2-DOG vermitteln und zur Selektion transformierter Pflanzen eingesetzt werden kann, die ansonsten phänotypisch normal und fertil sind. Aus Untersuchungen in Hefe war bekannt, daß Zugabe von 2-DOG, einem nicht-metabolisierbaren Glucoseanalogon, zur Inhibierung der Respiration und des Wachstums von Zellen führt (Heredia (1964) Biochem. Biophys. Acta 86, 216). In Hefezellen korreliert die Wachstumsinhibierung mit einer verminderten Synthese struktureller Polysaccharide (Kratky (1975) Eur. J. Biochem. 54, 459) und einer Blockierung der Proteinglykosylierung (Datema & Schwarz (1978) Eur. J. Biochem. 90, 505), die vermutlich durch Veränderungen der Zuckernucleotidkonzentrationen hervorgerufen werden. Über die biochemischen Änderungen hinaus führt die Zugabe von 2-DOG zu einer Reprimierung einer Vielzahl von Genen (zusammengefaßt in Gancedo (1992) Eur. J. Biochem. 206, 297). Analog zur Wirkungsweise metabolisierbarer Zucker (wie z.B. Glucose), wird dieser Prozeß als Katabolitrepression bezeichnet.

Untersuchungen an Hefezellen haben gezeigt, daß der 2-DOG Wirkmechanismus von der intrazellulären 2-DOG-6-P Konzentration abhängig ist. Molekulare Charakterisierung von Hefemutanten, die resistent gegenüber 2-DOG sind, ergab, daß die erworbene Resistenz auf der Überexpression einer spezifischen 2-DOG-6-P Phosphatase beruht (Sanz (1994) Yeast 10, 1195). Die hypothetische Wirkungsweise sowie der Wirkmechanismus der 2-DOG-6-P Phosphatase ist in Abbildung 1 dargestellt.

Im Gegensatz zu den zahlreichen Arbeiten über die Wirkungsweise von 2-DOG in tierischen Geweben, in Hefen und Bakterien gibt es allerdings nur wenige analoge Studien, die sich mit dem Stoffwechsel dieser Zucker in Pflanzen befassen. Bisher konnte in einigen Untersuchungen lediglich gezeigt werden, daß Zugabe von 2-DOG das Wurzelwachstum einer Vielzahl von Pflanzen hemmt (u.a. Flachs, Wicke, Klee,

Roggen, Gerste, Mais und Hafer (Stenlid (1959) *Physiol. Plant.* 12, 218; Farrar (1995) *J. Exp. Bot.* 46, 1859)). Darüber hinaus wird das Wachstum von *Nicotiana tabacum*-Zellen und *Picea excelsa* (Fichte)-Zellen in Gewebekultur durch 2-DOG stark gehemmt (Zemek (1975) *Z. Pflanzenphysiol.* 76, 114; Zemek (1976) *Z. Pflanzenphysiol.* 77, 95). Als Umsetzungsprodukte von 2-DOG in höheren Pflanzen konnte 2-DOG-1-P, 2-DOG-6-P, UDP-2-DOG sowie 2-DOG enthaltende Di- und Oligosaccharide nachgewiesen werden (Kocourek (1963) *Biochem. Biophys. Acta* 71, 497; Zemek (1975) *Z. Pflanzenphysiol.* 76, 114). Die Bildung dieser Stoffwechselprodukte wird für die inhibitorische Wirkung der 2-DOG verantwortlich gemacht. Für andere toxische Verbindungen, die als Selektionsmarker in der Pflanzentransformation eingesetzt werden, sind ebenfalls vielfältige Wirkungen auf den Metabolismus der Pflanze beschrieben. So führt z. B. die Zugabe von manchen Antibiotika oftmals zur Regeneration von transgenen Pflanzen, die physiologische und morphologische Veränderungen gegenüber dem Phänotyp des Wildtyps aufweisen und/oder steril sind.

Obwohl wie vorstehend erläutert auch 2-DOG eine Vielzahl von teilweise noch unbekannten biochemischen Änderungen in Zellen hervorruft, werden bei der Verwendung der erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküle in Verbindung mit der Selektion auf 2-DOG enthaltenden Medien phänotypisch normale und fertile transgene Pflanzen regeneriert.

Die DNA-Sequenz, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-DOG-6-P Phosphatase codiert, kann aus natürlichen Quellen isoliert werden, vorzugsweise Hefe, oder kann nach bekannten Verfahren synthetisiert werden.

Mittels gängiger molekularbiologischer Techniken ist es möglich (siehe z.B. Sambrook, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), verschiedenartige Mutationen in die DNA-Sequenz, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-DOG-6-P Phosphatase codiert, in den erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Molekülen einzuführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende Deletionen vom 5'- oder vom 3'- Ende der codierenden DNA-Sequenz die Synthese entsprechend verkürzter

Proteine erreicht werden kann. Ferner ist es möglich, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Addition entsprechender Signalsequenzen in bestimmten Kompartimenten der Pflanzenzelle lokalisiert sind. Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun, EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald, Plant J. 1 (1991), 95-106).

Andererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluß beispielsweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten K_m -Wert besitzen oder nicht mehr den normalerweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen.

Des weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat- oder Produktspezifität aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-Temperatur-Profil aufweisen.

Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküle oder Teile dieser Moleküle in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (vgl. Sambrook, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen eine Sequenzanalyse, eine Restriktionsanalyse und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die DNA-Sequenz, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-DOG-6-P Phosphatase codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- (a) DNA-Sequenzen, die eine Nucleotid-Sequenz umfassen, die die in SEQ ID NO. 2 angegebene Aminosäuresequenz codieren;
- (b) DNA-Sequenzen, die die in SEQ ID NO. 1 angegebene Nucleotidsequenz umfassen;
- (c) DNA-Sequenzen umfassend eine Nucleotidsequenz, die mit einem komplementären Strang der Nucleotidsequenz von (a) oder (b) hybridisieren;
- (d) DNA-Sequenzen umfassend eine Nucleotidsequenz, die zu einer Nucleotidsequenz von (c) degeneriert ist, und
- (e) DNA-Sequenzen, die ein Derivat, Analog oder Fragment einer Nucleotidsequenz von (a), (b), (c) oder (d) ist und für ein Protein codiert, das 2-DOG-6-P Phosphatase Aktivität besitzt.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind.

DNA-Sequenzen, die mit den DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-DOG-6-P Phosphatase codieren, hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden, die aus Hefe hergestellt wurden. Die Identifizierung und Isolierung derartiger DNA-Sequenzen kann dabei, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), z.B. unter Verwendung der DNA-Sequenzen erfolgen, die exakt oder im wesentlichen die unter SEQ ID NO. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenzen aufweisen bzw. die reversen Komplemente dieser DNA-Sequenzen aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe üblicher Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der in SEQ ID NO. 2 dargestellten übereinstimmt. Die DNA-

Sequenzen, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-DOG-6-P Phosphatase codieren, umfassen auch DNA-Sequenzen, deren Nucleotidsequenzen zu der einer der vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen degeneriert ist. Die Degeneration des genetischen Codes bietet dem Fachmann u.a. die Möglichkeit, die Nucleotidsequenz der DNA-Sequenz an die Codon-Präferenz des jeweiligen Wirts, vorzugsweise Pflanzen, anzupassen.

Die oben beschriebenen DNA-Sequenzen umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-DOG-6-P Phosphatase codieren. Unter "Fragmenten" werden dabei Teile der DNA-Sequenz verstanden, die lang genug sind, um eines der beschriebenen Proteine zu codieren. Der Ausdruck "Derivat" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen sich von den oben beschriebenen DNA-Sequenzen an einer oder mehreren Positionen unterscheiden aber einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, insbesondere eine Identität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %. Dabei weisen die durch diese DNA-Sequenzen codierten Proteine eine Sequenzidentität zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz von mindestens 80%, vorzugsweise 85% und besonders bevorzugt über 90%, 95%, 97% und 99% auf. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen DNA-Sequenzen können dabei beispielsweise durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Bei den DNA-Sequenzen, die homolog zu den oben beschriebenen Sequenzen sind und Derivate dieser Sequenzen darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Sequenzen, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der in den rekombinanten DNA-Molekülen enthaltenen DNA-Sequenzen codierten Proteine, die die biologische Aktivität einer 2-DOG-6-P Phosphatase besitzen, weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf, wie Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität oder Konformation oder physikalische Eigenschaften, wie das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform stammt die beschriebene DNA-Sequenz aus Hefe.

Zur Expression der in den erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Molekülen enthaltenen DNA-Sequenz in pflanzlichen Zellen ist diese mit regulatorischen Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Sinnvolle Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, besonders bevorzugt ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus, EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder ein Promotor, der während der Pflanzentransformation, der Pflanzenregeneration oder bestimmten Stadien dieser Prozesse aktiv ist, z.B. zellteilungsspezifische Promotoren wie der Histon H-3 Promotor (Kapros (1993), In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 29, 27-32) oder das chemisch-induzierbare Tet-System (Gatz (1991), Mol. Gen. Genet. 227, 229-237). Eine Übersicht weiterer in Frage kommender Promotoren ist z.B. in Ward (1993) Plant Mol. Biol. 22, 361-366 gegeben.

Weiterhin bevorzugt sind induzierbare oder zellspezifische Promotoren (z.B. Meristem).

Ferner ist eine Transkriptions-Terminationssequenz vorhanden, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dienen kann, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente, z.B. der Terminator des Octopinsynthesegens aus Agrobakterien, sind in der Literatur beschrieben (vgl. Giehlen, EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Promotor der 35S CAMV Promotor.

Die Erfindung betrifft ferner Vektoren, die erfindungsgemäße rekombinante DNA-Moleküle enthalten. Vorzugsweise handelt es sich dabei um Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik übliche Vektoren. Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Clonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E.coli-Zellen verwendet. Transformierte E.coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der erfindungsgemäße Vektor mindestens ein weiteres rekombinantes DNA-Molekül. Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle und Vektoren kann jede beliebige Information, die in einem weiteren rekombinanten DNA-Molekül enthalten ist, auf Pflanzen bzw.

Pflanzenzellen übertragen werden und anschließend mittels Selektion auf 2-DOG enthaltenden Medien auf die gewünschte Information selektioniert werden. Natürlich weiß der Fachmann, daß das rekombinante DNA-Molekül, das die zusätzliche Information enthält, nicht unbedingt in dem Vektor, der den Selektionsmarker trägt, anwesend sein muß, sondern auch mit diesem co-transformiert werden kann (Lyznik (1989) Plant Mol. Biol. 13, 151-161; Peng (1995) Plant Mol. Biol. 27, 91-104). Diese Möglichkeit bietet sich zum Beispiel an, wenn keine physikalische Koppelung des Markergens und der zu übertragenden Information gewünscht wird. In diesem Fall können nach der Selektion der primären transgenen Pflanze das Markergen und die gewünschte Information in nachfolgenden Kreuzungen unabhängig voneinander segregieren.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das weitere rekombinante DNA-Molekül eine DNA Sequenz, die ein Peptid, Protein, Antisense-, Sense-RNA, virale RNA, oder Ribozym codiert. Einige Beispiele zur heterologen (Über)expression und zur Antisense-Inhibierung mit dem Ziel, Stoffwechselwege in transgenen Pflanzen zu manipulieren, sind in Herbers & Sonnewald (1996) TIBTECH 14, 198-205 zusammengefaßt. Ein Beispiel für Ribozyme wurde von Feyter (1996) Mol. Gen. Genet. 250, 329-338 publiziert. Durch Expression eines "hammerhead" Ribozyms gelang es den Autoren, eine TMV-Resistenz in transgenen Tabakpflanzen zu erzeugen. Vielfältige Anwendungsmöglichkeiten von transgenen Pflanzen, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküle und Vektoren erzeugt werden können, sind auch in TIPTEC Plant Product & Crop Biotechnology, 13 (1995), 312-397 beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Vektoren können weitere Funktionseinheiten besitzen, die eine Stabilisierung des Vektors im Wirtsorganismus bewirken, wie einen bakteriellen Replikationsursprung oder die 2-Mikron-DNA zur Stabilisation in *Saccharomyces cerevisiae*. Ferner können "left border"- und "right border"-Sequenzen agrobakterieller T-DNA enthalten sein, wodurch eine stabile Integration in das Erbgut von Pflanzen ermöglicht wird. Eine weitere Strategie, Markerfreie transgene Pflanzen zu erzeugen, ist die Verwendung von Sequenz-spezifischen Rekombinasen. Zu diesem Zweck sind z.B. zwei Strategien einsetzbar: (i) Re-Transformation einer Rekombinase exprimierenden Ausgangslinie und Auskreuzung der Rekombinase

nach erfolgter Entfernung des Selektionsmarkers, welches mit dem gewünschten Gen assoziiert war. (ii) Co-Transformation mit anschließender Auskreuzung. Voraussetzung für diese Rekombinase-Strategie sind (i) Flankierung des Selektionsmarkers mit Erkennungssequenzen für die Rekombinase und (ii) eine Rekombinase, die in Pflanzen aktiv ist und keine Pflanzen-eigenen Sequenzen zur Rekombination nutzt. Derartige Verfahren kann der Fachmann dem Stand der Technik entnehmen, z.B. RecA (Reiss (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3094-3098), Cre/lox (Bayley (1992) Plant Mol. Biol. 18, 353-361), FLP/FRT (Lloyd (1994) Mol. Gen. Genet. 242, 653-657), Gin (Maeser (1991) Mol. Gen. Genet. 230, 170-176) und R/RS (Onouchi (1991) Nucl. Acids Res. 19, 6373-6378).

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküle oder Vektoren transient oder stabil enthalten. Unter einer Wirtszelle wird ein Organismus verstanden, der in der Lage ist, *in vitro* rekombinierte DNA aufzunehmen und gegebenenfalls die in den erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Molekülen enthaltene DNA-Sequenz zu exprimieren.

Vorzugsweise sind dies prokaryontische oder eukaryontische Zellen. Insbesondere betrifft die Erfindung Pflanzenzellen, die die erfindungsgemäßen Vektorsysteme oder Derivate oder Teile davon enthalten. Diese sind vorzugsweise aufgrund der Aufnahme der erfindungsgemäßen Vektorsysteme, Derivate oder Teile der Vektorsysteme zu einer Synthese von Enzymen befähigt, die die biologische Aktivität einer 2-DOG-6-P Phosphatase besitzen. Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen Zellen dadurch gekennzeichnet, daß das eingeführte erfindungsgemäße rekombinante DNA-Molekül entweder heterolog in Bezug auf die transformierte Zelle ist, d.h. natürlicherweise nicht in diesen Zellen vorkommt, oder an einem anderen Ort im Genom lokalisiert ist als die entsprechende natürlicherweise auftretende Sequenz.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Kits, die ein erfindungsgemäßes rekombinantes DNA Molekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten und gegebenenfalls 2-DOG oder eine zu 2-DOG äquivalente chemische Verbindung. So wurden z.B. von Schmidt (1978) (Eur. J. Biochem. 87,

55-68) 2-Desoxy-2-fluoro-D-glucose bzw. Mannose als markierte Analoga beschrieben.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküle und Vektoren ist es möglich, 2-DOG als Selektionsmittel für die Pflanzentransformation zu benutzen, vorzugsweise zur Selektion transformierter Pflanzen, die von Hochleistungssorten abstammen, für die die im Stand der Technik beschriebenen Selektionsmarker oftmals nur im beschränkten Maße von Nutzen sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur Selektion transformierter Pflanzenzellen, das die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) Gewinnung von Pflanzenzellen;
- (b) Einführung eines erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküls oder Vektors in diese Pflanzenzellen; und
- (c) Selektion der erfolgreich transformierten Pflanzenzellen auf 2-DOG enthaltenden Medien oder auf Medien, die eine zu 2-DOG funktionell äquivalente chemische Verbindung enthalten.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, sollte ein selektierbarer Marker vorhanden sein.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters, Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobacterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobacterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und beschrieben in EP-A-120 516; Hoekema: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985), Chapter V, Fraley, Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An, EMBO J. 4 (1985), 277-287.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird der erfindungsgemäße Vektor in dem erfindungsgemäßen Verfahren mittels Agrobacterium tumefaciens in Pflanzenzellen übertragen.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches 2-DOG oder eine funktionell äquivalente Chemikalie zur Selektion transformierter Zellen enthält, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten

der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Christou (1996) Trends in Plant Science 1, 423-431; Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes, die elektrisch oder chemisch induzierte DNA-Aufnahme in Protoplasten, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Makroinjektion von DNA in Blütenstände, die Mikroinjektion von DNA in Mikrosporen und Pro-Embryonen, die DNA-Aufnahme durch keimenden Pollen und die DNA-Aufnahme in Embryonen durch Quellung (zur Übersicht: Potrykus, Physiol. Plant (1990), 269 - 273).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan, Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei, Plant J. 6 (1994), 271-282; Bytebier, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 5345 - 5349; Raineri, Bio/Technology 8 (1990), 33 - 38; Gould, Plant Physiol. 95 (1991), 426 - 434; Mooney, Plant, Cell Tiss. & Org. Cult. 25 (1991), 209 - 218; Li, Plant Mol. Biol. 20 (1992), 1037 - 1048).

Drei der oben genannten Transformationssysteme konnten in der Vergangenheit für verschiedene Getreide etabliert werden: die Elektroporation von Gewebe, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer durch Partikel-Beschuß in regenerierbare Gewebe und Zellen (zur Übersicht: Jähne, Euphytica 85 (1995), 35 - 44). Die Transformation von Weizen wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (zur Übersicht: Maheshwari, Critical Reviews in Plant Science 14 (2) (1995), 149 - 178).

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße rekombinante DNA-Molekül oder der erfindungsgemäße Vektor in dem erfindungsgemäßen Verfahren mittels Particle-Bombardment (biolistische Verfahren) übertragen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch transgene Pflanzenzellen, die ein erfindungsgemäßes rekombinantes DNA-Molekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten oder durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten wurden sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartig transformierten Pflanzenzellen abstammen. Derartige Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens ein erfindungsgemäßes rekombinantes DNA-Molekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, in dem es natürlicherweise nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Pflanzenzelle mindestens ein weiteres Fremdgen. Wie bereits in der Einleitung dieser Patentanmeldung erwähnt, ist für die Möglichkeit der Steuerung komplexer Stoffwechselprozesse die Manipulation mehrerer enzymatischer Schritte notwendig und daher die Möglichkeit transgene Pflanzen mehrfach zu transformieren essentiell. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküle und Vektoren kann der Fachmann nun auf neue Marker zur Selektion mehrfach transformierter Pflanzenzellen zurückgreifen.

Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen und Pflanzengewebe, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. In Abhängigkeit des gewählten Promotors (z.B. 35S CaMV) sind auch die adulten Pflanzen resistent gegen 2-DOG und können durch Gabe dieser Verbindung selektioniert werden. Bei Verwendung von z.B. gewebespezifischen Promotoren entfällt diese Möglichkeit und der Fachmann kann z.B. auf molekularbiologische Methoden wie PCR zurückgreifen, um diese Pflanzen zu identifizieren. Auf der anderen Seite kann der Fachmann natürlich auch, z.B. nach Selbstung oder Rückkreuzung gegen den Elter, Samen solcher Pflanzen auf 2-DOG enthaltende Medien auslegen und anhand der Keimfähigkeit dieser Samen oder

Überleben der Pflanzen in einem späteren Stadium der Entwicklung (abhängig vom gewählten Promotor) rückschließen, ob die Pflanzen transgen sind oder nicht. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen wie Weizen, Gerste, Reis, Raps, Erbse, Mais, Zuckerrübe, Zuckerrohr oder Kartoffel.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial und Ernteprodukte der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge etc.

Wie oben bereits dargelegt, stellt die vorliegende Erfindung rekombinante DNA-Moleküle und Vektoren zur Verfügung, die als Selektionsmarker in Pflanzenzellen zur Selektion transformierter Pflanzenzellen geeignet sind sowie davon abgeleitete transgene Pflanzen, Pflanzenzellen und/oder Gewebe. So betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Moleküls oder eines erfindungsgemäßen Vektors zur Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen und/oder Gewebe sowie deren Nutzung als selektierbare Marker in pflanzlicher Zell- und Gewebekultur und/oder Pflanzenzüchtung.

Die Figuren zeigen:

Figur 1

Möglicher Mechanismus der Wachstumsinhibierung durch 2-Desoxyglucose (2-DOG) und Aufhebung der toxischen Wirkung durch Expression einer 2-DOG-6-P Phosphatase.

Figur 2

- A. Kultivierung von Tabak- und Kartoffelblattscheiben auf 2-DOG-haltigem MS-Medium. TOB, *Nicotiana tabacum* Var. Samsun NN; POT, *Solanum tuberosum* var. Solara; A, E: Kontrolle MS-Medium ohne Zusatz von 2-Desoxyglucose; B,

F: MS-Medium mit 0.05 % 2-DOG; C, G: MS-Medium mit 0.1 % 2-DOG; D, H: MS-Medium mit 0.5 % 2-DOG.

- B. Kultivierung von Erbsen-, Raps- und Weizenblattscheiben auf 2-DOG-haltigem MS-Medium. R, Raps; P, Erbse; W, Weizen.
0.0, 0.1 und 0.5: zugesetzte 2-DOG Konzentration in %.

Figur 3

Schematische Darstellung der PCR-Amplifikation der 2-DOG-6-P Phosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* Stamm 288C

Figur 4

Pflanzliche Expressionskassette zur Überexpression des DOGR¹ Gens aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* Stamm S288C) in transgenen Pflanzen

Fragment A (529 bp): Beinhaltet den 35S Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV umfaßt.

Fragment B: DOGR¹ Gen aus Hefe, welches als BamHI/Sall Fragment aus dem Plasmid pGEMT-DOGR¹ isoliert wurde (s. Abbildung 3).

Fragment C (192 bp): Enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5.

Die Fragmente A bis C wurden über EcoRI/HindIII in den binären Vektor BIN19 (Bevan (1984) Nucl. Acid Res. 12, 8711) cloniert.

Figur 5

Nachweis des DOGR¹-Gens mittels PCR-Amplifikation in genomischer DNA der transgenen Tabakpflanzen.

Spuren 1 und 14, DNA-Längenstandard; Spuren 2-10, unabhängige Transformanten; Spur 11, untransformierte Kontrollpflanze; Spur 12, Positivkontrolle (Plasmid pGEMT-DOGR¹); Spur 13, Wasserkontrolle.

Figur 6

Nachweis der Expression des chimären DOGR¹-Gens in 2-DOG resistenten Tabakpflanzen mittels RNA-Analyse.

Northern-Analyse transgener Tabakpflanzen der Linie 35S-DOG. Gesamt RNA wurde aus Tabakblättern isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der radioaktiv markierten Kodierregion des DOGR¹ Gens. Pro Spur sind 20 µg RNA aufgetragen. Spuren 1-9, unabhängig transformierte Pflanzen der Linie 35S-DOG; Spur 10, untransformierte Kontrolle.

Figur 7

Nachweis der durch das DOGR¹-Gen vermittelten Resistenz in der Nachkommenschaft transgener Tabakpflanzen.

Samen von *Nicotiana tabaccum* Var. Samsun NN wurden sterilisiert und auf MS-Medium mit 0,05% 2-DOG ausgelegt. A: vier Wochen alte Keimlinge einer untransformierten Pflanze; B: vier Wochen alte Keimlinge einer das DOGR¹-Gen unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimierenden Pflanze

Figur 8

Nachweis der durch das DOGR¹-Gen vermittelten Resistenz in Sprossen transgener Kartoffelpflanzen.

Sprosse von Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* var. Solara wurden auf 0,05% 2-DOG enthaltendes MS-Medium gesetzt. A: fünf Wochen alter Spross einer untransformierten Pflanze; B: fünf Wochen alter Spross einer das DOGR¹-Gen unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimierenden Pflanze

Figur 9

Pflanzliche Expressionskassette zur Überexpression des DOG^{R1}-Gens aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* Stamm 288C) in transgenen Erbsenpflanzen.

Fragment A (529 bp): Beinhaltet den 35S Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV umfaßt

Fragment B (73 bp): untranslatierter Translationsenhancer aus dem Tabak Mosaik Virus U1 (Gallie (1987) Nucl. Acids Res. 15, 8693)

Fragment C: DOG^{R1}-Gen aus Hefe

Fragment D (192 bp): Enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5

Die Fragmente A bis D wurden über EcoRI/HindIII in den binären Vektor pGPTV (Becker (1992) PMB 20, 1195) kloniert

Figur 10

Nachweis der durch das DOG^{R1}-Gen vermittelten Resistenz in Erbsenpflanzen. Kallus von Erbsenpflanzen *Pisum sativum* wurden auf 0,075% 2-DOG enthaltendes B5-Medium gelegt. A: Kallus untransformierter Pflanze auf 0,075% 2-DOG; B: Kallus von das DOG^{R1}-Gen unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimierenden Pflanzen auf 0,075% 2-DOG

In den Beispielen verwendete Methoden:

1. Allgemeine Clonierungsverfahren

Clonierungsverfahren wie z.B.: Restriktionsspaltungen, DNA-Isolierung, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E.coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden nach Sambrook (Cold Spring Harbor Laboratory Press

(1989); ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt. Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in YEB Medium (Vervliet, Gen. Virol. (1975) 26, 33).

2. Bakterienstämme

E. coli (XL-1 Blue) Bakterien wurden durch die Firma Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation eingesetzte *Agrobacterium* Stamm (C58C1 mit dem Plasmid pGV 3850kan) wurde von Deblaere (1985, Nucl. Acid Res. 13, 4777) beschrieben.

3. Analyse von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben

Pflanzliche Gesamt-RNA wurde nach der Methode von Logemann (1987, Analytical Biochem. 163, 16) isoliert und in Formaldehyd-haltigen Agarosegelen aufgetrennt (Lehrach (1977) Biochem. 16, 4743). Ein Kappilar-Transfer auf Nylon-Membranen (Gene Screen, NEN) erfolgte in 20 x SSC (1.5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat) über Nacht. Nach zweistündiger Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer (500 mM Natriumphosphat (pH 7.2), 7 % SDS, 1 % Rinderserumalbumin, 200 µg Heringssperma DNA, 1 mM EDTA), erfolgte die Hybridisierung mit der radioaktiv-markierten DOG^{R1}-Sonde bei 55°C für 16 Stunden. Als Sonde wurde die DOG^{R1} Codierregion aus dem Plasmid pGEMT isoliert und mittels High Prime Kit (Boehringer) in Anwesenheit von α -³²P-dCTP radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Filter unter folgenden Bedingungen gewaschen: 20 Minuten bei 55°C in 6 x SSC, 0.1 % SDS und 20 Minuten bei 55°C in 4 x SSC, 0.1 % SDS.

4. Bestimmung von DOG-6-P in Pflanzenextrakten

Zum Nachweis der 2-DOG-6-P Phosphatase Aktivität in den transgenen Pflanzen wurden Blattscheiben (ca. 100 mg Frischgewicht) in 300 mM 2-DOG Lösung für 24 Stunden im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Blattscheiben 1 Minute mit Wasser gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Extraktion der

Metabolite wurde das Pflanzenmaterial in auf Trockeneis vorgekühlten Mörsern zu einem feinen Pulver homogenisiert und mit 1.5 ml 16 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) in Diethylether (vorgekühlt auf 4°C) versetzt. Anschließend wurden die Homogenate 15 Minuten auf Trockeneis inkubiert. Durch Zugabe von 0.8 ml 16 % TCA (w/v), 5 mM EGTA wurden die Metabolite gelöst. Nach Transfer der Homogenate in Eppendorfreaktionsgefäße wurden diese 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 15 000 UpM und 4°C in einer Biofuge 15R (Heraeus) zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und viermal mit wassergesättigtem Ether gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit 5 M KOH/1 M Triethanolamin-Gemisch neutralisiert und für 1 Minute mit Stickstoff begast. Die so vorbereiteten Proben wurden mittels HPLC analysiert. Für die Analyse wurde ein HPLC System der Firma Dionex verwendet, welches mit einer PA-1 (4 x 250 mm) Säule und einem gepulsten elektrochemischen Detektor ausgestattet war. Vor der Injektion wurden die Proben für 2 Minuten bei 13 000 UpM abzentrifugiert. Metabolite wurden anschließend mit einem 50-minütigen konkaven Gradienten (Kurve 9) von 1 mM bis 500 mM Natriumacetat nach 40 Minuten bei 10 mM NaOH und einer Durchflußrate von 1 ml/min. eluiert. Isokratische Elution wurde für weitere 5 Minuten durchgeführt. Zur Identifizierung und Quantifizierung von 2-DOG-6-P wurde als Standard 2-DOG-6-P der Firma Sigma verwendet.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Nachweis der Toxizität von 2-Desoxyglucose (2-DOG) für Pflanzenzellen

Zum Nachweis der Toxizität von 2-DOG wurden Blattstücke (ca. 1 cm²) von sterilen Tabak- und Kartoffelpflanzen auf Murashige und Skoog-Medium (Murashige & Skoog (1962) Physiol. Plant. 15, 473), dem 0.01 bis 0.5 % 2-DOG zugesetzt wurde, für zwei Wochen kultiviert. Wie in Abbildung 2 gezeigt, führt Zusatz von 2-DOG (Abb. 2, B-D und F-H) zum Absterben der Blattscheiben.

Beispiel 2: PCR-Amplifikation der 2-DOG-6-F Phosphatase aus *Saccharomyces cerevisiae* Stamm S288C

Die Clonierung der DOGR¹ Codierregion erfolgte mittels der Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente genomische Hefe DNA, die aus *Saccharomyces cerevisiae* Stamm S288C nach Standardprotokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der spezifischen Primer DOGR¹-1 (5'-ATGGATCCCCATGGCAGAATTTTCAGCTGATCTATG-3'; SEQ ID NO:3) und DOGR¹-2 (5' ATGTCGACTACTCAGGCCCTTGTCAAAGGGTTG-3'; SEQ ID NO:4), die von einer publizierten Sequenz abgeleitet wurden (Sanz (1994) Yeast 10, 1195-1202). Primer 1 umfaßt die Basen 1 bis 26 und Primer 2 die Basen 720 bis 741 der Codierregion des DOGR¹ Gens. Zur Clonierung der amplifizierten DNA in pflanzliche Expressionsvektoren tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer 1, BamHI und NcoI; Primer 2, Sall. Die Clonierungsstrategie ist in Abbildung 3 dargestellt. Das PCR Reaktionsgemisch (50µl) enthielt chromosomale Hefe DNA (1µg), Primer 1 und 2 (jeweils 1µg), 10 mM Tris-HCl (pH 8.8 bei 25°C), 3.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100, 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 2 Units PrimeZyme DNA Polymerase (Biometra). Vor Zugabe der Polymerase wurde das Gemisch 10 Minuten auf 94°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (60 Zyklen) wurden in einem automatischen "Thermocycler" (Perkin Elmer) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung bei 94°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 40°C (1 Minute), Polymerase-Reaktion bei 72°C (1 Minute). Das erhaltene Fragment wurde in den Vektor pGEMT (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399, USA) cloniert, wodurch das Plasmid pGEMT-DOGR¹ erhalten wurde. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert.

Beispiel 3: Herstellung von Plasmid p35S-DOGR¹

Eine DNA-Sequenz, die für eine 2-DOG-6-P Phosphatase codiert, wurde aus dem Plasmid pGEMT-DOGR¹ isoliert und mit dem 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-

Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzen bewirkt, sowie einem pflanzlichen Transkriptions-Terminationssignal versehen. Das pflanzliche Transkriptions-Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase Gens. Das Plasmid p35S-DOGR¹ beinhaltet drei Fragmente A, B und C, die in die Schnittstellen für Restriktionsenzyme des Polylinkers von pUC 18 cloniert wurden (s. Abbildung 4). Das Fragment A beinhaltet den 35S Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV umfaßt (Franck (1980) Cell 21, 285) und wurde als EcoRI-KpnI Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak (1986) Nucleic Acid Res. 14, 5857) isoliert und zwischen die EcoRI-KpnI Schnittstellen des Plasmids pUC18 cloniert.

Das Fragment B enthält die DOGR¹ Codierregion, die als BamHI-SalI Fragment aus dem Plasmid pGEMT-DOGR¹ (s. Abb. 3) isoliert und zwischen die BamHI-SalI Schnittstellen des Polylinkers von pUC18 cloniert wurde.

Das Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen (1984) EMBO J. 3, 835), Nukleotide 11749 - 11939, welches als PvuII-HindIII Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella (1983) Nature 303, 209) isoliert worden ist und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen SphI-HindIII Schnittstellen des Polylinkers von pUC 18 cloniert war.

Das chimäre Gen wurde anschließend als EcoRI-HindIII Fragment zwischen die EcoRI-HindIII Schnittstellen des Plasmids pBIN19 (Bevan (1984) Nucleic. Acid Res. 12, 8711) cloniert.

Beispiel 4: Selektion von DOGR¹ transformierten Pflanzenzellen und Pflanzenregeneration auf 2-DOG enthaltendem Medium

10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Bakterien in gleichen Volumen Antibiotika-freien Medium resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler *Nicotiana tabacum* Var. Samsun NN Pflanzen (ca. 1cm²), denen die Mittelrippe entfernt wurde, in dieser Bakterienkultur

gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen, die MS-Medium mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto Agar enthalten, dicht ausgelegt. Nach 2tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium übertragen, welches 0.05% 2-DOG, 400 mg/l β -Bactyl, 1 mg/l Benzaminopurin (BAP), 0.2 mg/l Naphthylessigsäure (NAA), 1.6 % Glucose und 0.8% Bacto Agar enthielt. Nach Callusbildung wurden die Blattscheiben bis zur Sproßbildung auf MS-Medium übertragen, welches 0.02% 2-DOG, 400 mg/l β -Bactyl, 1 mg/l Benzaminopurin (BAP), 0.2 mg/l Naphthylessigsäure (NAA), 1.6 % Glucose und 0.8% Bacto Agar enthielt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 200 mg/l β -Bactyl und 2 % Saccharose zur Wurzelbildung überführt. Anschließend wurden bewurzelte Sprosse in Erdkultur überführt und im Gewächshaus kultiviert.

Beispiel 5: Nachweis des chimären DOGR¹-Gens in den transformierten Pflanzen mittels PCR

Zum Nachweis der erfolgreichen Transformation wurde genomische DNA der transgenen Tabakpflanzen nach der Methode von Rogers und Bendich (Plant Mol. Biol. (1985) 5, 69) isoliert und das chimäre DOGR¹ Gen mittels PCR-Amplifikation nachgewiesen. Das PCR Reaktionsgemisch (50 μ l) enthielt genomische Tabak DNA (1 μ g), Primer 1 und 2 (jeweils 1 μ g), 10 mM Tris-HCl (pH 8.8 bei 25°C), 3.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100, 200 μ M dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 2 Units PrimeZyme DNA Polymerase (Biometra). Vor Zugabe der Polymerase wurde das Gemisch 10 Minuten auf 94°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (40 Zyklen) wurden in einem automatischen "Thermocycler" (Perkin Elmer) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung bei 94°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 40°C (1 Minute), Polymerase-Reaktion bei 72°C (1 Minute). Anschließend wurde ein Aliquot der PCR-Reaktion in einem Agarosegel aufgetrennt. Wie in Abbildung 5 dargestellt, wird unter Verwendung genomischer DNA transgener Pflanzen als Matriz ein ca. 740 Basenpaar großes DNA-Fragment amplifiziert, welches unter Verwendung genomischer DNA von untransformierten Kontrollpflanzen nicht nachweisbar ist.

Beispiel 6: Nachweis der Expression des chimären DOG^{R1}-Gens in 2-DOG-resistenten Tabakpflanzen mittels RNA-Analyse

Die Expression der 2-DOG-6-P Phosphatase in den regenerierten Pflanzen wurde mittels RNA-Analysen verifiziert. Hierzu wurden Blattproben der ins Gewächshaus überführten Pflanzen geerntet, Gesamt-RNA extrahiert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen übertragen und mit der Codierregion des DOG^{R1} Gens hybridisiert. Wie in Abbildung 6 dargestellt, konnte in den auf 2-DOG regenerierten Tabakpflanzen die 2-DOG-6-P Phosphatase mRNA nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktion mit untransformierten Tabakpflanzen konnte nicht beobachtet werden.

Beispiel 7: In vivo Nachweis der 2-DOG-6-P Phosphatase Aktivität

Der Nachweis der in vivo Funktionalität der 2-DOG-6-P Phosphatase wurde wie folgt durchgeführt: 0.78 cm² große Blattscheiben von untransformierten Tabakpflanzen und den Transformanten 35S-DOG-3, 4, 8, 9 und 11 wurden 24 Stunden in einer 300 mM 2-DOG Lösung im Dunkeln inkubiert. Zur Detektion des gebildeten 2-DOG-6-P wurden die phosphorylierten Intermediate isoliert und mittels HPLC aufgetrennt. Wie in Tabelle 1 dargestellt, führt die Expression der 2-DOG-6-P Phosphatase zu einer Verminderung der 2-DOG-6-P Akkumulation.

Tabelle 1: Nachweis von 2-DOG-6-P in Blattscheiben von transgenen und untransformierten Tabakpflanzen

Genotyp	[$\mu\text{mol m}^{-2}$]	[% der Kontrolle]
	2-DOG-6-P	2-DOG-6-P
Kontrolle	576 \pm 40	100
35S-DOG-3	170 \pm 26	31 \pm 6.0
35S-DOG-4	223 \pm 18	40 \pm 6.0
35S-DOG-8	103 \pm 11	18 \pm 3.0
35S-DOG-9	250 \pm 24	45 \pm 7.0
35S-DOG-11	283 \pm 12	50 \pm 5.0

Legende: Kontrolle, untransformierte *Nicotiana tabacum* Var. Samsun NN Pflanze; 35S-DOG, transgene Pflanzen; die Daten entsprechen den Mittelwerten ($n=4$) \pm Standardabweichung.

Beispiel 8: Nachweis der durch das DOG^{R1}-Gen vermittelten Resistenz in der Nachkommenschaft transgener Tabakpflanzen

Zum Nachweis der Resistenz von Keimlingen die das DOG^{R1}-Gen exprimieren wurden Samen der in Beispiel 5 und 6 beschriebenen Tabakpflanzen sowie Samen untransformierter Tabakpflanzen sterilisiert und auf 0,05% 2-DOG enthaltendes MS-Medium ausgelegt. Wie in Abbildung 7 dargestellt, sind die Keimlinge die das DOG^{R1}-Gen unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimieren nach vier Wochen vital, wohingegen die Keimlinge der untransformierten Pflanzen in einem frühen Entwicklungsstadium abgestorben sind.

Beispiel 9: Nachweis der durch das DOG^{R1}-Gen vermittelten Resistenz in Sprossen von Kartoffelpflanzen

In Kartoffelpflanzen *Solanum tuberosum* var. Solara wurde durch Agrobakterien vermittelte Transformation das im Beispiel 3 beschriebenen Konstrukt übertragen. Die regenerierten Sprosse wurden auf selektionsfreiem Medium angezogen. Die Sprossspitzen wurden nach sechs Wochen überführt auf 0,05% 2-DOG enthaltendes MS-Medium. Wie in Abbildung 8 dargestellt, ist der Spross einer untransformierten Pflanze nach fünf Wochen nicht gewachsen, wohingegen der Spross, der das DOG^{R1}-Gen unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimiert, Wurzel- und Stammwachstum zeigt.

Beispiel 10: Herstellung des Plasmids p35S Omega-DOG^{R1} zur Transformation von Erbse

Zur Transformation von Erbse *Pisum sativum* wurde in pUC18 ein Konstrukt erstellt, welches den 35S Promotor aus Cauliflower Mosaik Virus, einen untranslatierten Transkriptionenhancer des Tabak Mosaik Virus U1 (Sonnewald (1992) Plant Journal 2 (4) 571), das DOG^{R1}-Gen und einen Transkriptionsterminator OCS enthält. Dieses Konstrukt wurde als EcoRI/HindIII Fragment in den binären Vektor pGPTV (Becker (1992) PMB 20, 1195) eingeführt.

Beispiel 11: Selektion von DOG^{R1} transformierten Erbsenzellen und Pflanzenregeneration auf 2-DOG enthaltendem Medium

Sterile unreife Samen von Erbse *Pisum sativum* wurden 2-3 Tage in flüssigem auxin- / cytokininhaltigem Medium vorkultiviert. Danach wurden longitudinale Schnitte der Embryonenachse präpariert und für 1h in einer Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* inkubiert. Die Explantate wurden danach auf festes Pflanzenmedium übertragen. Nach 4tägiger Inkubation auf modifiziertem B5-Medium im diffusen Licht bei 22°C wurden die Explantate gewaschen und auf festes auxin- / cytokinin- und 0,075% 2-DOG haltiges Medium übertragen. Die Selektion erfolgte auf

verschiedenen Wuchsstoffkonzentrationen mit einem permanenten Selektionsdruck von 0,075% 2-DOG. Regenerierte Sprosse wurden auf untransformierte Sämlinge gepfropft, in Erde überführt und im Gewächshaus kultiviert.

Beispiel 12: Nachweis der durch das DOG^{R1}-Gen vermittelten Resistenz in Blättern von Erbsenpflanzen

Auf Erbsenpflanzen *Pisum sativum* wurde durch Agrobakterien vermittelte Transformation das im Beispiel 10 beschriebenen Konstrukt übertragen. Kallus transformierter und nicht transformierter Pflanzen wurden auf 0,075% 2-DOG enthaltendes Medium gelegt. Wie in Abbildung 10 dargestellt, entwickelt der Kallus untransformierter Pflanzen keine Sprosse, wohingegen der nach Transformation mit dem DOG^{R1}-Gen unter der Kontrolle des 35S Promotors entwickelte Kallus Sprosse bildet.

GGT	ACC	ATA	GTG	AGT	ACA	ACA	GTG	GCC	GCA	GAG	AAA	GCA	TGG	ACC	AAG	98
Gly	Thr	Ile	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Ala	Trp	Thr	Lys	
15					20					25					30	
TTG	TGT	TAC	GAA	TAC	GGT	GTT	GAT	CCT	TCC	GAG	TTA	TTT	AAG	CAT	TCT	146

Leu Cys Tyr Glu Tyr Gly Val Asp Pro Ser Glu Leu Phe Lys His Ser	
35 40 45	
CAT GGT GCA AGA ACA CAA GAG GTT TTG AGA AGG TTT TTC CCT AAA TTG	194
His Gly Ala Arg Thr Gln Glu Val Leu Arg Arg Phe Phe Pro Lys Leu	
50 55 60	
GAT GAT ACA GAC AAT AAA GGT GTT CTT GCT CTA GAA AAA GAT ATT GCC	242
Asp Asp Thr Asp Asn Lys Gly Val Leu Ala Leu Glu Lys Asp Ile Ala	
65 70 75	
CAT AGT TAC TTG GAT ACA GTA AGC CTT ATT CCT GGT GCA GAG AAC TTA	290
His Ser Tyr Leu Asp Thr Val Ser Leu Ile Pro Gly Ala Glu Asn Leu	
80 85 90	
CTG TTA TCG TTA GAT GTA GAT ACT GAG ACT CAA AAA AAG TTA CCT GAA	338
Leu Leu Ser Leu Asp Val Asp Thr Glu Thr Gln Lys Lys Leu Pro Glu	
95 100 105 110	
AGG AAA TGG GCT ATC GTT ACC TCT GGT TCT CCA TAT TTG GCA TTT TCA	386
Arg Lys Trp Ala Ile Val Thr Ser Gly Ser Pro Tyr Leu Ala Phe Ser	
115 120 125	
TGG TTC GAG ACA ATA TTG AAA AAT GTT GGA AAG CCC AAA GTT TTC ATT	434
Trp Phe Glu Thr Ile Leu Lys Asn Val Gly Lys Pro Lys Val Phe Ile	
130 135 140	
ACT GGG TTT GAC GTG AAG AAC GGT AAG CCT GAT CCC GAG GGT TAT TCA	482
Thr Gly Phe Asp Val Lys Asn Gly Lys Pro Asp Pro Glu Gly Tyr Ser	
145 150 155	
AGA GCT CGT GAT TTA TTG CGT CAA GAT TTG CAA TTA ACT GGT AAA CAG	530
Arg Ala Arg Asp Leu Leu Arg Gln Asp Leu Gln Leu Thr Gly Lys Gln	
160 165 170	
GAT CTG AAG TAT GTT GTC TTC GAA GAT GCA CCC GTG GGC ATA AAG GCC	578
Asp Leu Lys Tyr Val Val Phe Glu Asp Ala Pro Val Gly Ile Lys Ala	
175 180 185 190	
GGC AAA GCA ATG GGC GCC ATT ACT GTG GGT ATA ACA TCC TCG TAT GAC	626
Gly Lys Ala Met Gly Ala Ile Thr Val Gly Ile Thr Ser Ser Tyr Asp	
195 200 205	
AAG AGC GTT TTA TTT GAC GCA GGA GCA GAT TAT GTA GTC TGT GAT TTG	674
Lys Ser Val Leu Phe Asp Ala Gly Ala Asp Tyr Val Val Cys Asp Leu	
210 215 220	
ACA CAG GTT TCC GTG GTT AAG AAC AAT GAA AAC GGT ATT GTC ATC CAG	722
Thr Gln Val Ser Val Val Lys Asn Asn Glu Asn Gly Ile Val Ile Gln	
225 230 235	
GTA AAC AAC CCT TTG ACA AGG GCC TGAGTAGTCG AC	758
Val Asn Asn Pro Leu Thr Arg Ala	
240 245	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 246 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

Met Ala Glu Phe Ser Ala Asp Leu Cys Leu Phe Asp Leu Asp Gly Thr
 1           5           10           15

Ile Val Ser Thr Thr Val Ala Ala Glu Lys Ala Trp Thr Lys Leu Cys
      20           25           30

Tyr Glu Tyr Gly Val Asp Pro Ser Glu Leu Phe Lys His Ser His Gly
      35           40           45

Ala Arg Thr Gln Glu Val Leu Arg Arg Phe Phe Pro Lys Leu Asp Asp
      50           55           60

Thr Asp Asn Lys Gly Val Leu Ala Leu Glu Lys Asp Ile Ala His Ser
      65           70           75           80

Tyr Leu Asp Thr Val Ser Leu Ile Pro Gly Ala Glu Asn Leu Leu Leu
      85           90           95

Ser Leu Asp Val Asp Thr Glu Thr Gln Lys Lys Leu Pro Glu Arg Lys
      100          105          110

Trp Ala Ile Val Thr Ser Gly Ser Pro Tyr Leu Ala Phe Ser Trp Phe
      115          120          125

Glu Thr Ile Leu Lys Asn Val Gly Lys Pro Lys Val Phe Ile Thr Gly
      130          135          140

Phe Asp Val Lys Asn Gly Lys Pro Asp Pro Glu Gly Tyr Ser Arg Ala
      145          150          155          160

Arg Asp Leu Leu Arg Gln Asp Leu Gln Leu Thr Gly Lys Gln Asp Leu
      165          170          175

Lys Tyr Val Val Phe Glu Asp Ala Pro Val Gly Ile Lys Ala Gly Lys
      180          185          190

Ala Met Gly Ala Ile Thr Val Gly Ile Thr Ser Ser Tyr Asp Lys Ser
      195          200          205

Val Leu Phe Asp Ala Gly Ala Asp Tyr Val Val Cys Asp Leu Thr Gln
      210          215          220

Val Ser Val Val Lys Asn Asn Glu Asn Gly Ile Val Ile Gln Val Asn
      225          230          235          240

Asn Pro Leu Thr Arg Ala
      245

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ATGGATCCCC ATGGCAGAAT TTTCAGCTGA TCTATG

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATGTCGACTA CTCAGGCCCT TGTCAAAGGG TTG

33

Patentansprüche

1. Rekombinantes DNA-Molekül umfassend
 - (a) regulatorische Sequenzen eines in Pflanzen aktiven Promotors;
 - (b) operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-Desoxyglucose-6-Phosphat (2-DOG-6-P) Phosphatase codiert; und
 - (c) operativ daran gebunden regulatorische Sequenzen, die als Transkriptions-Terminations und/oder Polyadenylierungssignale in Pflanzen dienen können.
2. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 1, wobei die DNA-Sequenz, die ein Protein mit der biologischen Aktivität einer 2-DOG-6-P Phosphatase codiert, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
 - (a) DNA-Sequenzen, die eine Nucleotid-Sequenz umfassen, die die in SEQ ID NO. 2 angegebene Aminosäuresequenz codiert;
 - (b) DNA-Sequenzen, die die in SEQ ID NO. 1 angegebene Nucleotidsequenz umfassen;
 - (c) DNA-Sequenzen umfassend eine Nucleotidsequenz, die mit einem komplementären Strang der Nucleotid-Sequenz von (a) oder (b) hybridisiert;
 - (d) DNA-Sequenzen umfassend eine Nucleotidsequenz, die zu einer Nucleotidsequenz von (c) degeneriert ist, und
 - (e) DNA-Sequenzen, die ein Derivat, Analog oder Fragment einer Nucleotidsequenz von (a), (b), (c) oder (d) ist und für ein Protein codiert, das 2-DOG-6-P Phosphatase Aktivität besitzt.
3. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, wobei die DNA-Sequenz aus Hefe stammt.
4. Rekombinantes DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Promotor der 35S CaMV Promotor ist.

5. Vektor umfassend ein rekombinantes DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
6. Vektor nach Anspruch 5, der mindestens ein weiteres rekombinantes DNA-Molekül enthält.
7. Vektor nach Anspruch 6, wobei das weitere rekombinante DNA-Molekül eine DNA-Sequenz enthält, die ein Peptid, Protein, Antisense-, Sense-RNA, virale RNA oder Ribozym codiert.
8. Wirtszelle, enthaltend ein rekombinantes DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 5 bis 7.
9. Kit umfassend ein rekombinantes DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 5 bis 7 und gegebenenfalls 2-Desoxyglucose oder eine zu 2-Desoxyglucose funktionell äquivalente chemische Verbindung.
10. Verfahren zur Selektion transformierter Pflanzenzellen, das die folgenden Schritte umfaßt:
 - (a) Gewinnung von Pflanzenzellen;
 - (b) Einführung eines rekombinanten DNA-Moleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder eines Vektors nach einem der Ansprüche 5 bis 7 in diese Pflanzenzellen; und
 - (c) Selektion der erfolgreich transformierten Pflanzenzellen auf 2-Desoxyglucose-enthaltenden Medien oder auf Medien, die eine zu 2-Desoxyglucose funktionell äquivalente chemische Verbindung enthalten.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der Vektor nach einem der Ansprüche 5 bis 7 mittels *Agrobacterium tumefaciens* in Pflanzenzellen übertragen wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das rekombinante DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder der Vektor nach einem der Ansprüche 5 bis 7 mittels Partikel-Bombardment in Pflanzenzellen übertragen wird.
13. Transgene Pflanzenzelle enthaltend ein rekombinantes DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 5 bis 7 oder hergestellt nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12.
14. Pflanzenzelle nach Anspruch 13, die mindestens ein weiteres Fremdgen enthält.
15. Pflanzengewebe umfassend Pflanzenzellen nach Anspruch 13 oder 14 oder hergestellt nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12.
16. Transgene Pflanze enthaltend eine Pflanzenzelle nach Anspruch 13 oder 14 oder hergestellt nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12.
17. Ernteprodukte der Pflanze nach Anspruch 16 umfassend Pflanzenzellen nach Anspruch 13 oder 14.
18. Vermehrungsmaterial der Pflanzen nach Anspruch 16, umfassend Pflanzenzellen nach Anspruch 13 oder 14.
19. Verwendung eines DNA-Moleküls, das eine DNA-Sequenz umfaßt wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 3 definiert ist, eines rekombinanten DNA-Moleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder eines Vektors nach einem der Ansprüche 5 bis 7 zur Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen und/oder Gewebe.
20. Verwendung eines DNA-Moleküls, das eine DNA-Sequenz umfaßt wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 3 definiert ist, eines rekombinanten DNA-Moleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder eines Vektors nach einem der

Ansprüche 5 bis 7 als selektierbarer Marker in pflanzlicher Zell- und Gewebekultur und/oder Pflanzenzüchtung.

1/12

Möglicher Mechanismus der Wachstumsinhibierung durch 2-Desoxyglucose (2-DOG) und Aufhebung der toxischen Wirkung durch Expression einer 2-DOG-6-P Phosphatase

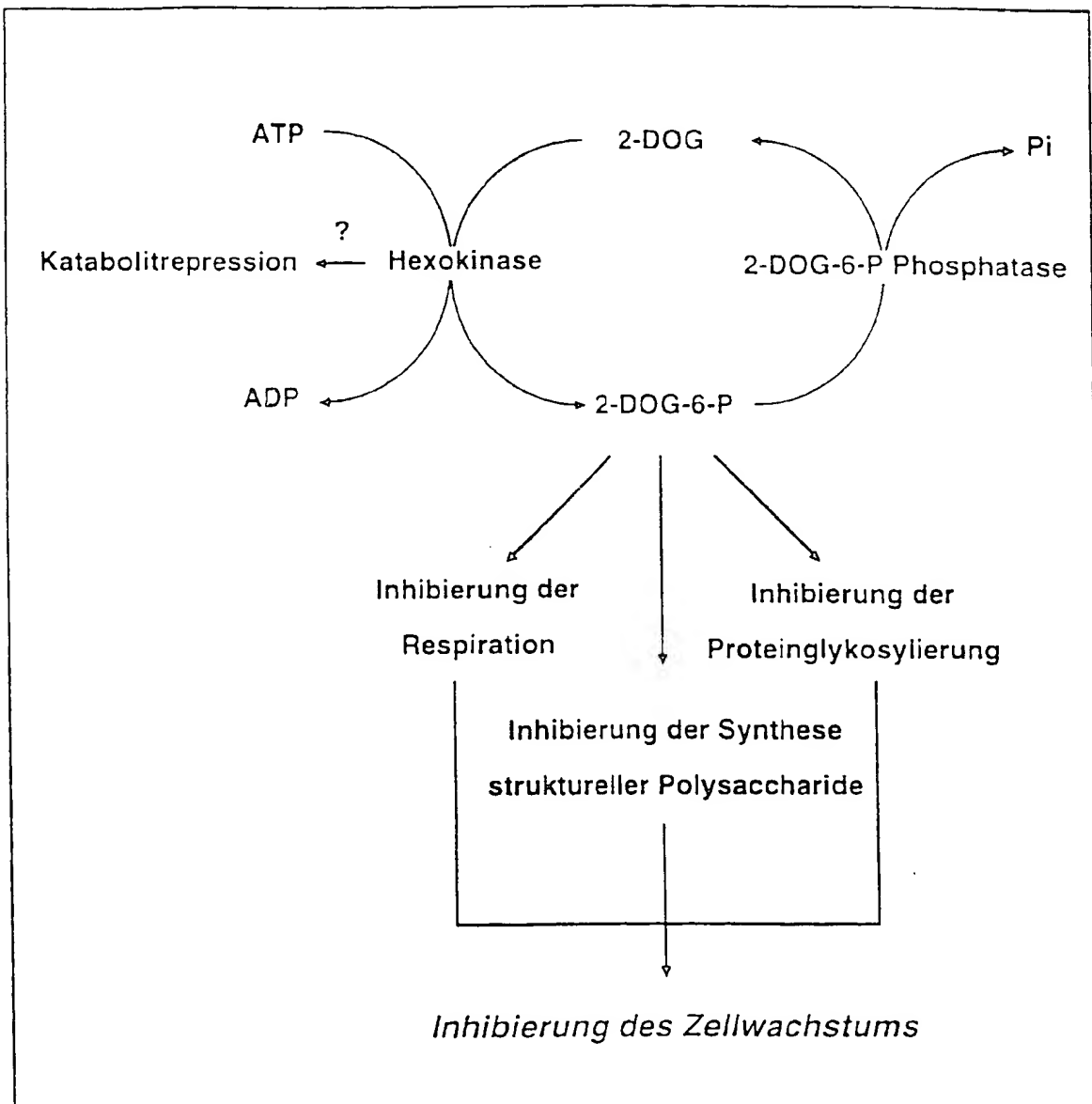


Abbildung 1

2/12

Nachweis der Toxizität von 2-Desoxyglucose:
Tabak

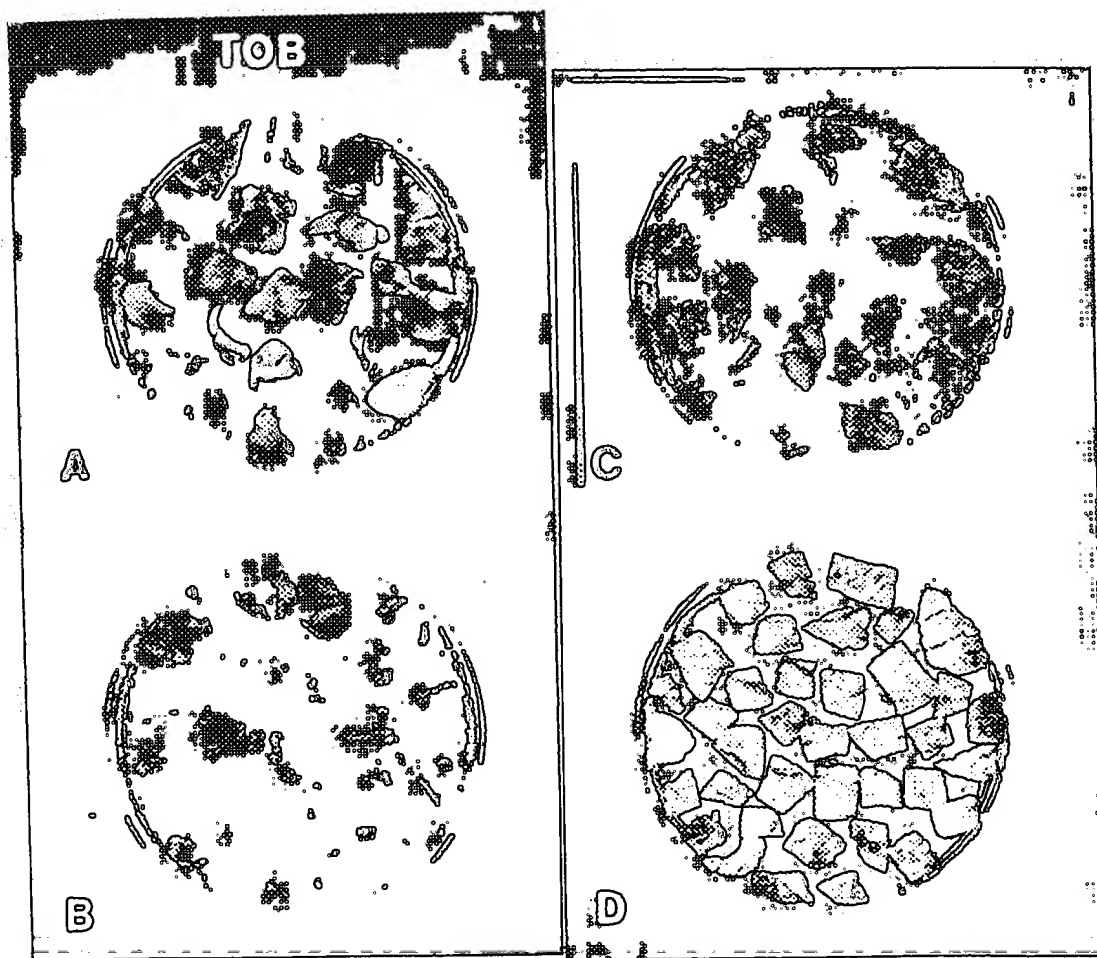


Abbildung 2A

3/12

Nachweis der Toxizität von 2-Desoxyglucose:
Kartoffel

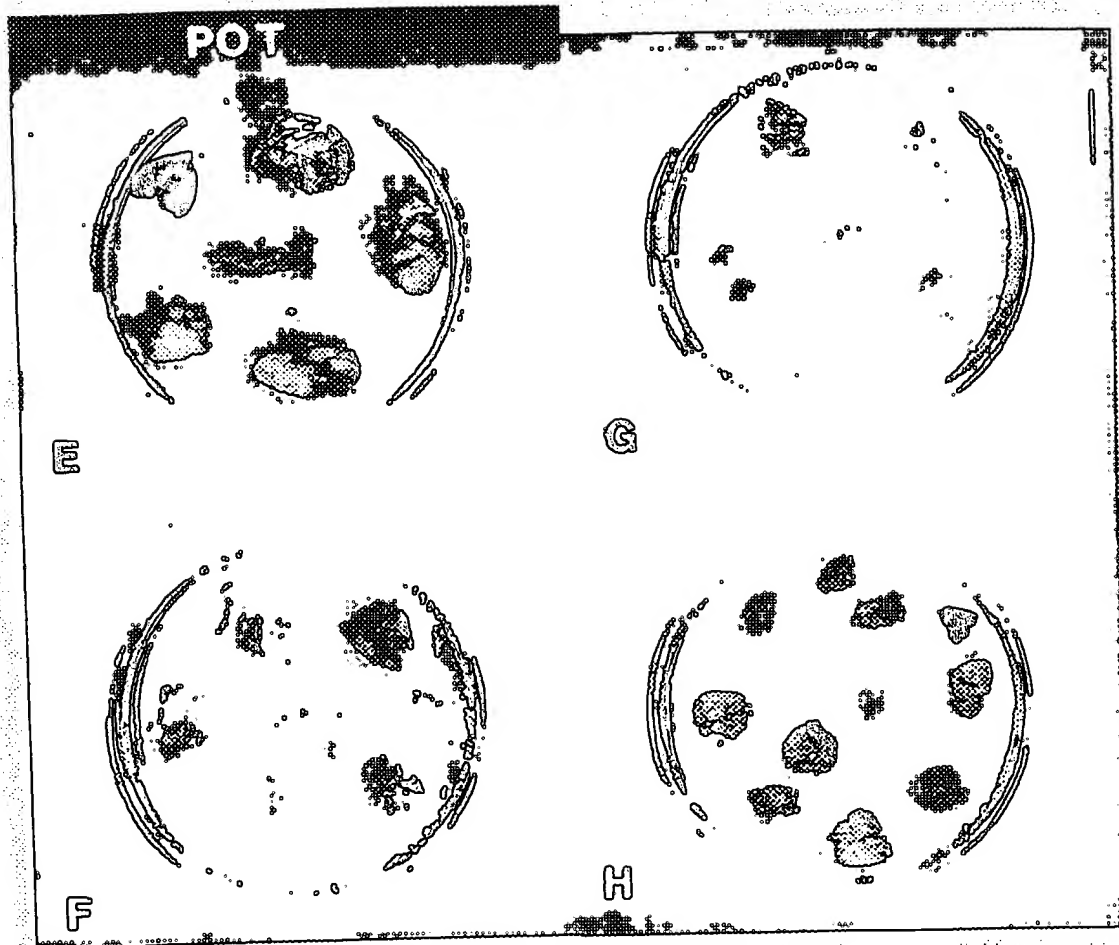


Abbildung 2A (Fortsetzung)

4/12

Nachweis der Toxizität von 2-Desoxyglucose:
Erbse, Raps & Weizen

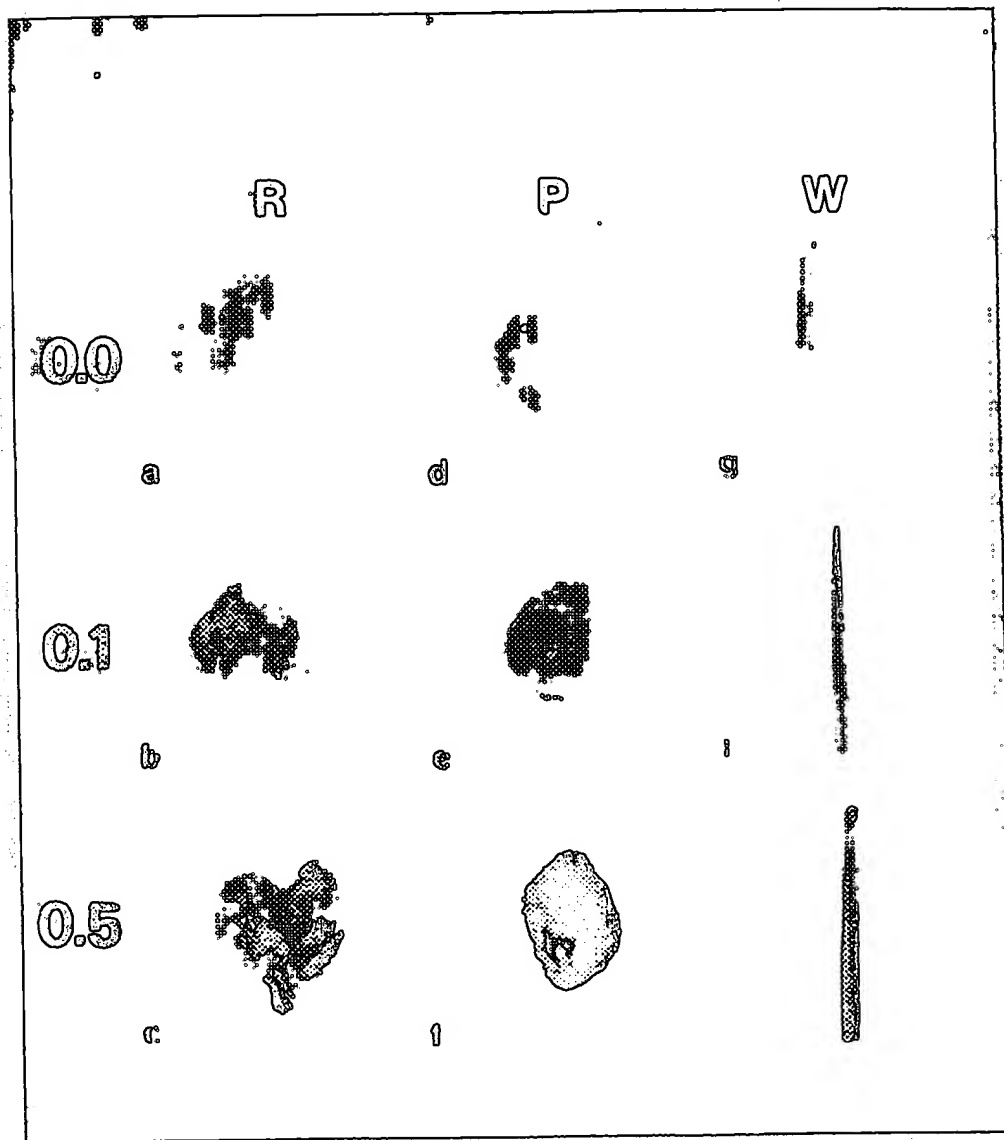


Abbildung 2B

5/12

PCR-Amplifikation und Klonierung des DOG^R1 Gens aus Saccharomyces cerevisiae

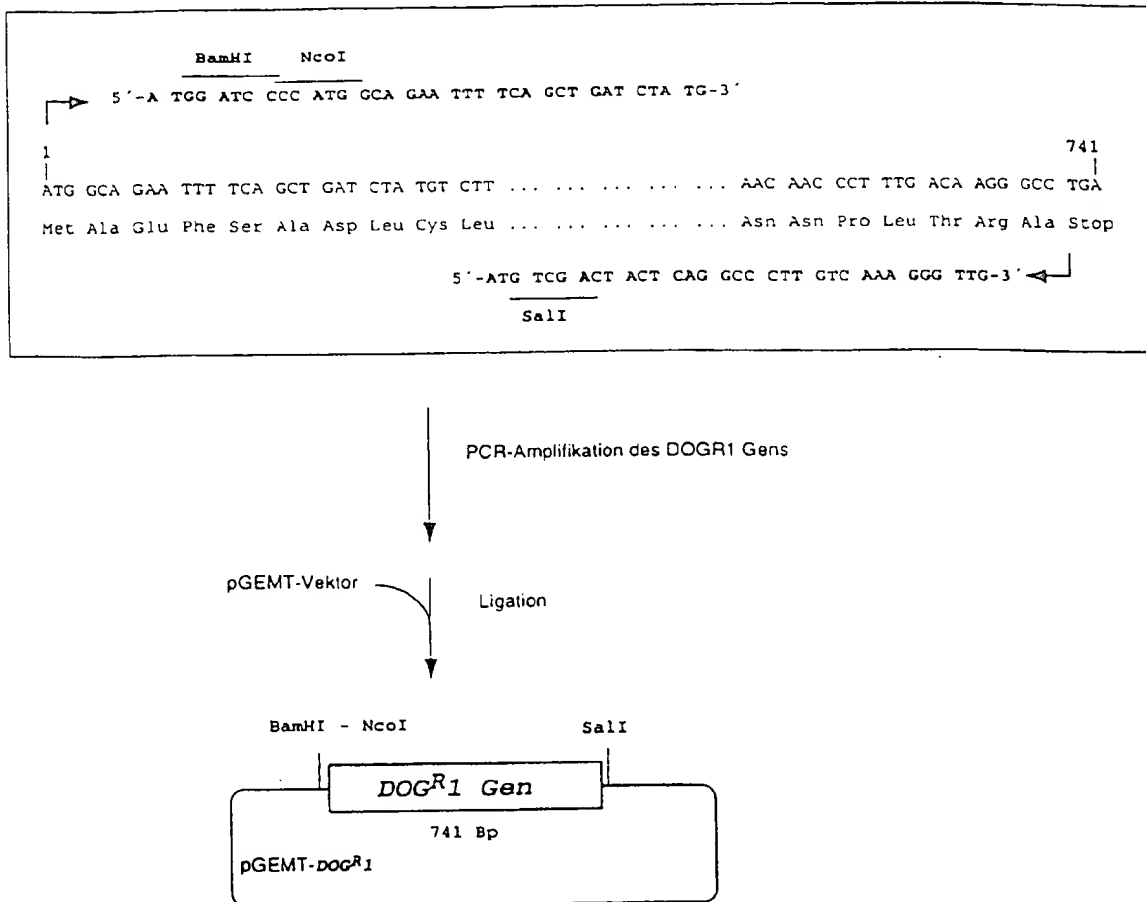


Abbildung 3

6/12

Binärer Vektor zur Überexpression des DOG^R₁ Gens aus Hefe in transgenen Pflanzen

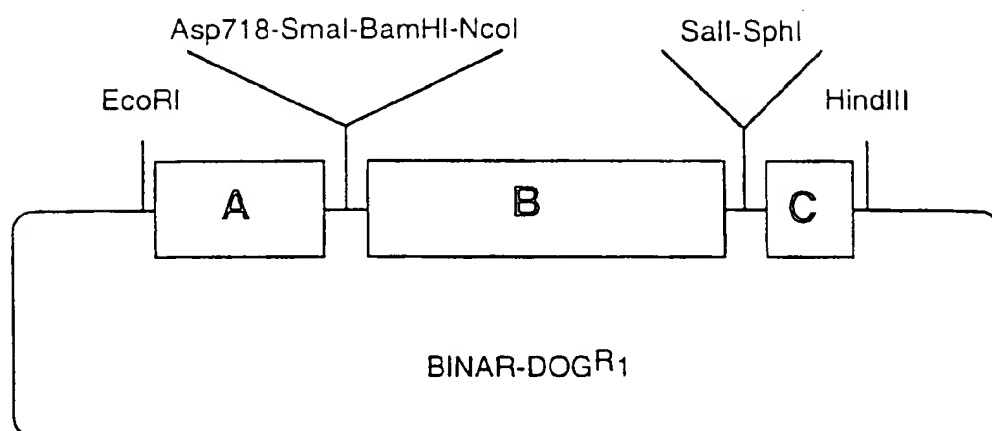


Abbildung 4

7/12

Nachweis des DOG^R₁-Gens mittels PCR-Amplifikation in
genomischer DNA transgener Tabakpflanzen

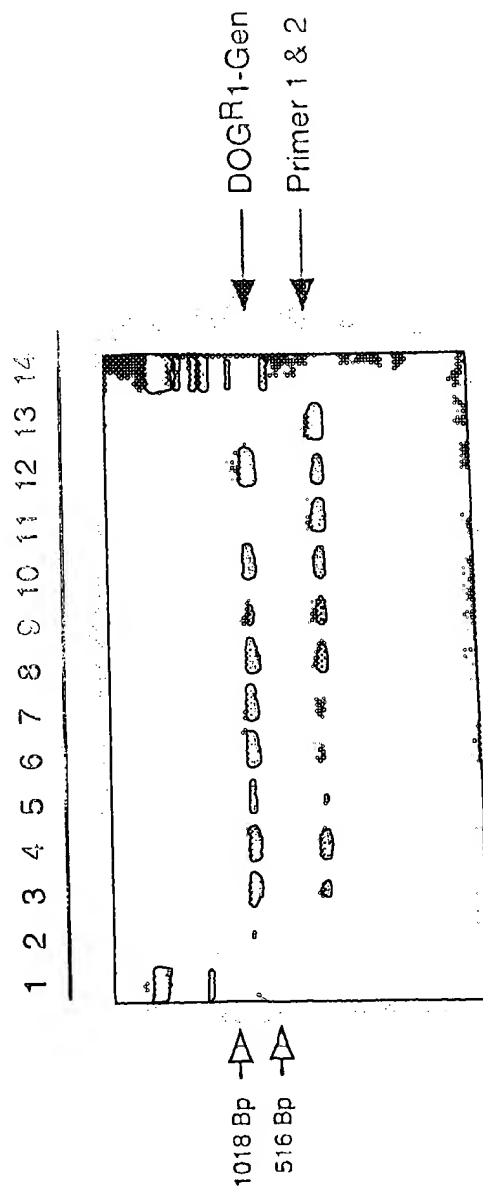


Abbildung 5

8/12

Nachweis des DOG^R1-mRNA mittels Northern Analyse in Blättern
von transgenen Tabakpflanzen

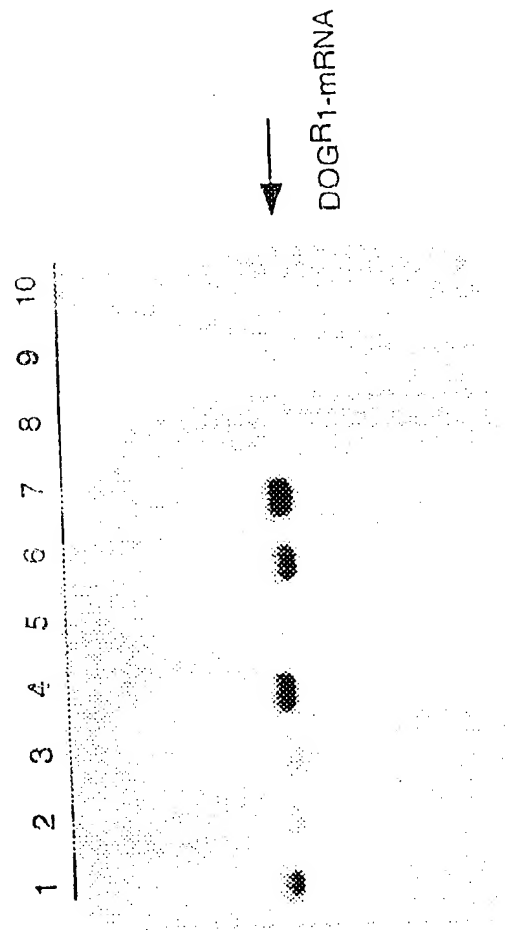


Abbildung 6

9/12

Nachweis der durch das DOG^R1-Gen vermittelten Resistenz:
Samen transgener Tabakpflanzen



Abbildung 7

10/12

Nachweis der durch das DOG^R1-Gen vermittelten Resistenz:
transgene Kartoffelpflanzen

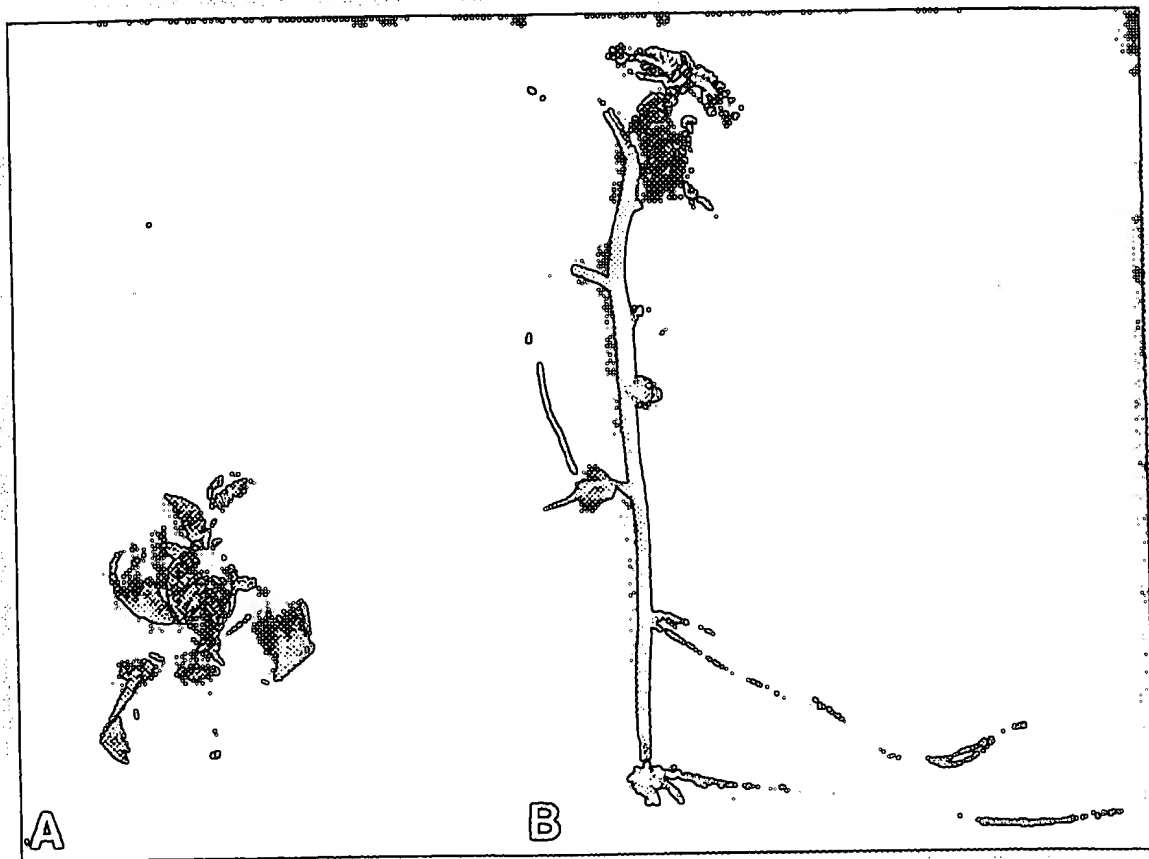


Abbildung 8

11/12

Binärer Vektor zur Überexpression des DOG^R1 Gens aus Hefe in transgenen Erbsenpflanzen

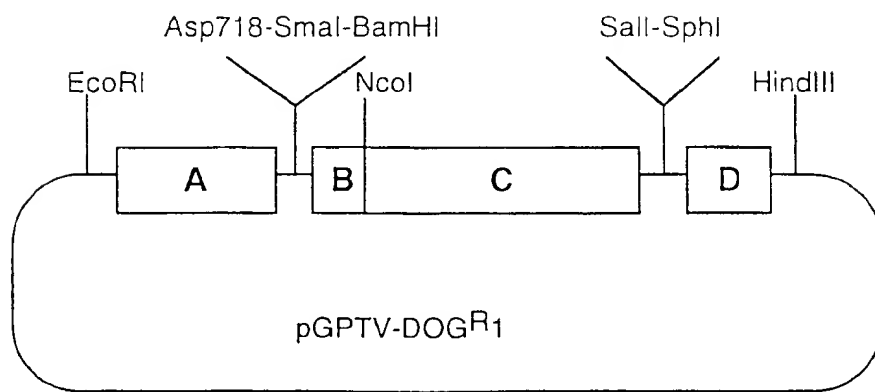


Abbildung 9

12/12

Nachweis der durch das DOG^R1-Gen vermittelten Resistenz:
Kallus transgener Erbsenpflanzen

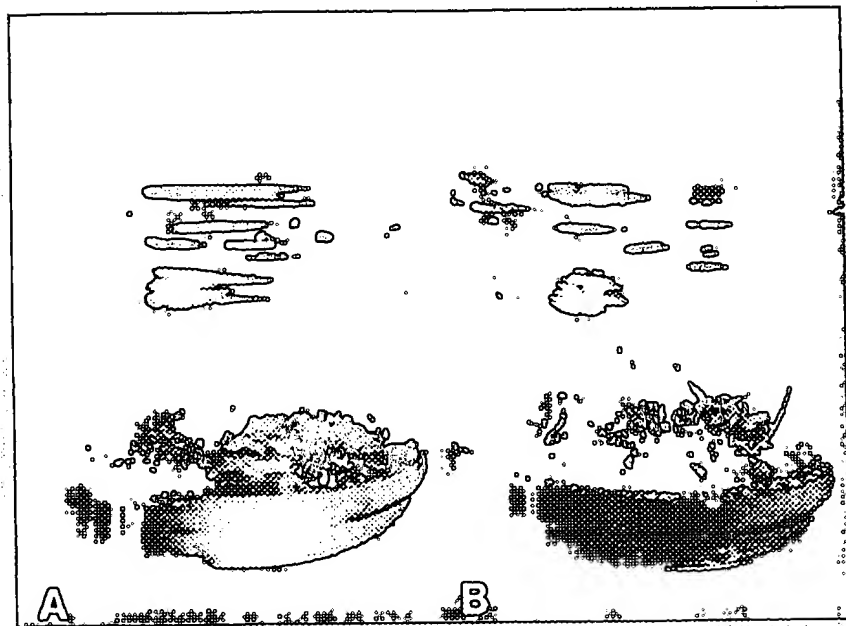


Abbildung 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/02069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	F. RANDEZ-GIL ET AL: "DOG(R)1 and DOG(R)2: two genes from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> that confer 2-deoxyglucose resistance when overexpressed" YEAST, vol. 11, no. 13, October 1995, NEW YORK US, pages 1233-1240, XP002040749 see the whole document	1, 10
A	---	2-9, 11-20
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 July 1998

Date of mailing of the international search report

30/07/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/02069

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE WPI Week 7709 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 77-15528Y XP002040752 & JP 52 007 423 (MEIJI SEIKA CO) , 2 January 1977 see abstract & JP 52 007 423 A ---</p>	10
Y	<p>WO 94 20627 A (SANDOZ AG) 15 September 1994 cited in the application see page 1 - page 9 ---</p>	1
A	<p>---</p>	4-6,9, 11-20
A	<p>WO 96 31612 A (SEMINIS VEGETABLES) 10 October 1996 see page 1 - page 11 ---</p>	1-20
A	<p>EP 0 289 478 A (MONSANTO CO) 2 November 1988 see page 1 - page 4 ---</p>	1-4
A	<p>G STENLID: "Species differences between plant roots in the reaction to inhibitory sugars" PHYSIOLOGICA PLANTARUM, vol. 12, 1959, COPENHAGEN DK, pages 218-235, XP002040750 cited in the application see the whole document ---</p>	1
A	<p>J ZEMEK ET AL.: "Effect of 2-deoxy-d-glucose on tissue culture of Nicotiana tabacum L. (cv. Virginia Bright Italia)" ZEITSCHRIFT FÜR PLANZENPHYSIOLOGIE, vol. 76, no. 2, 1975, STUTTGART DE, pages 114-119, XP002040751 cited in the application see the whole document -----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/02069

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9420627 A	15-09-1994	AU 682495 B	09-10-1997
		AU 6207794 A	26-09-1994
		CA 2157470 A	15-09-1994
		EP 0804599 A	05-11-1997
		HU 73387 A	29-07-1996
		JP 8509861 T	22-10-1996
		SK 107095 A	06-12-1995
		US 5767378 A	16-06-1998
		ZA 9401467 A	04-09-1995
WO 9631612 A	10-10-1996	AU 5535196 A	23-10-1996
		EP 0820518 A	28-01-1998
EP 0289478 A	02-11-1988	CA 1324096 A	09-11-1993

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02069

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/82 C12N9/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	F. RANDEZ-GIL ET AL: "DOG(R)1 and DOG(R)2: two genes from Saccharomyces cerevisiae that confer 2-deoxyglucose resistance when overexpressed" YEAST, Bd. 11, Nr. 13, Oktober 1995, NEW YORK US, Seiten 1233-1240, XP002040749	1, 10
A	siehe das ganze Dokument --- -/--	2-9, 11-20



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Juli 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/07/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

De Kok, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02069

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
Y	<p>DATABASE WPI Week 7709 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 77-15528Y XP002040752 & JP 52 007 423 (MEIJI SEIKA CO) , 2. Januar 1977 siehe Zusammenfassung & JP 52 007 423 A</p>	10
Y	<p>WO 94 20627 A (SANDOZ AG) 15. September 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 1 - Seite 9</p>	1
A	<p>---</p>	4-6, 9, 11-20
A	<p>WO 96 31612 A (SEMINIS VEGETABLES) 10. Oktober 1996 siehe Seite 1 - Seite 11</p>	1-20
A	<p>---</p>	
A	<p>EP 0 289 478 A (MONSANTO CO) 2. November 1988 siehe Seite 1 - Seite 4</p>	1-4
A	<p>---</p>	
A	<p>G STENLID: "Species differences between plant roots in the reaction to inhibitory sugars" PHYSIOLOGICA PLANTARUM, Bd. 12, 1959, COPENHAGEN DK. Seiten 218-235, XP002040750 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p>	1
A	<p>---</p>	
A	<p>J ZEMEK ET AL.: "Effect of 2-deoxy-d-glucose on tissue culture of Nicotiana tabacum L. (cv. Virginia Bright Italia)" ZEITSCHRIFT FÜR PLANZENPHYSIOLOGIE, Bd. 76, Nr. 2, 1975, STUTTGART DE, Seiten 114-119, XP002040751 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p>	1
	<p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02069

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9420627 A	15-09-1994	AU 682495 B	09-10-1997
		AU 6207794 A	26-09-1994
		CA 2157470 A	15-09-1994
		EP 0804599 A	05-11-1997
		HU 73387 A	29-07-1996
		JP 8509861 T	22-10-1996
		SK 107095 A	06-12-1995
		US 5767378 A	16-06-1998
		ZA 9401467 A	04-09-1995
WO 9631612 A	10-10-1996	AU 5535196 A	23-10-1996
		EP 0820518 A	28-01-1998
EP 0289478 A	02-11-1988	CA 1324096 A	09-11-1993